



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108872580 B

(45) 授权公告日 2021. 07. 02

(21) 申请号 201810627818.4

G01N 33/531 (2006.01)

(22) 申请日 2018.06.19

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 106645727 A, 2017.05.10

申请公布号 CN 108872580 A

CN 103743901 A, 2014.04.23

(43) 申请公布日 2018.11.23

CN 101762705 A, 2010.06.30

(73) 专利权人 山东农业大学

CN 105203757 A, 2015.12.30

地址 271018 山东省泰安市岱宗大街61号

CN 105572375 A, 2016.05.11

CN 105158471 A, 2015.12.16

(72) 发明人 刁有祥 唐熠 于相龙

WO 2014040040 A1, 2014.03.13

CN 106771180 A, 2017.05.31

(74) 专利代理机构 济南誉丰专利代理事务所

马波等. 鹅细小病毒vp1 基因的原核表达及抗原性分析.《中国兽医科学》.2010,第40卷(第02期),第135-137页.

(普通合伙企业) 37240

代理人 李茜

审查员 石维平

(51) Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

权利要求书2页 说明书8页

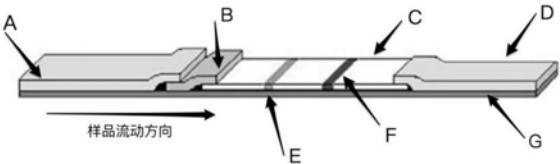
序列表2页 附图1页

(54) 发明名称

一种检测新型鹅细小病毒的胶体金试纸条及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测新型鹅细小病毒的胶体金试纸条,所述胶体金试纸条包括PVC板,依次搭接固定于PVC板上的样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸;所述结合垫是结合有胶体金颗粒标记新型鹅细小病毒单克隆抗体的玻璃纤维膜;所述硝酸纤维素膜上沿样品流动方向依次设有检测线和质控线,所述检测线包被兔抗新型鹅细小病毒VP1蛋白的多克隆抗体,所述质控线包被羊抗鼠IgG抗体。采用该胶体金试纸条检测新型鹅细小病毒,检测时间短、成本低、结果易判断,适用性强,非常适合于基层养殖场中新型鹅细小病毒的检测。



1. 一种检测新型鹅细小病毒的胶体金试纸条,其特征在于,所述新型鹅细小病毒导致雏鸭出现短喙长舌综合征;所述胶体金试纸条包括PVC板,依次搭接固定于PVC板上的样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸;

所述结合垫是结合有胶体金颗粒标记新型鹅细小病毒单克隆抗体的玻璃纤维膜;

所述硝酸纤维素膜上沿样品流动方向依次设有检测线和质控线,所述检测线包被兔抗新型鹅细小病毒VP1蛋白的多克隆抗体,所述质控线包被羊抗鼠IgG抗体;

所述硝酸纤维素膜为whatman硝酸纤维素膜IMMUNOPORE®诊断膜;

所述玻璃纤维膜为Ahlstrom8964;

所述胶体金试纸条由如下方法制备而成:

(1) 调节胶体金溶液的pH为9.0,向胶体金溶液中加入新型鹅细小病毒的单克隆抗体,使单克隆抗体的终浓度为8-10 μ g/ml;震荡反应25-35min,加入封闭液,再震荡反应15-25min,离心,弃去上清,将沉淀用含有BSA和叠氮化钠的碳酸钠溶液溶解,制备得到胶体金颗粒标记的新型鹅细小病毒的单克隆抗体;

(2) 将步骤(1)制备的胶体金颗粒标记的新型鹅细小病毒的单克隆抗体涂在玻璃纤维膜上,得到结合垫;

(3) 将兔抗新型鹅细小病毒VP1蛋白的多克隆抗体和羊抗鼠IgG抗体分别点射于硝酸纤维素膜上,形成含有检测线和质控线的硝酸纤维素膜;

(4) 在PVC板上依次搭接固定样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,即制备得到胶体金试纸条;

步骤(1)中,所述胶体金溶液按照如下方法制备:

在去离子水中加入1%氯金酸溶液,加热至沸腾,再加入6ml 1%柠檬酸三钠溶液,至不变色;再加热反应10min,停止加热,搅拌15min,即制备得到胶体金溶液;所述去离子水、1%氯金酸溶液和1%柠檬酸三钠溶液加入的体积比为200:2:6;

所述胶体金溶液中的胶体金的粒径为25-30nm;

所述新型鹅细小病毒VP1蛋白的多克隆抗体的制备方法如下:

针对新型鹅细小病毒VP1全基因序列设计了一对特异性引物,利用PCR技术扩增,得到2199bp的VP1基因全序列;根据同源重组的原理,利用拓扑异构酶I,将此基因克隆到原核表达载体pDE1中,获得了重组质粒pDE1-VP1;将重组质粒转化至大肠杆菌E.coli BL21中,经终浓度为0.2mmol/L IPTG诱导大量表达,经过6h后,表达量达到高峰;收集菌液并用超声波裂解细胞,并分别收集上清及沉淀进行SDS-PAGE分析,通过不同浓度尿素对以包涵体形式存在的VP1蛋白进行变性处理,得到纯化的VP1蛋白;将VP1蛋白与弗氏佐剂混和后免疫兔,通过ELISA方法检测血清抗体效价,经过4次免疫,两个月后采血并收集血清,通过正辛酸-硫酸铵法对血清进行纯化,得到纯化的兔抗新型鹅细小病毒多克隆抗体;

所述特异性引物为:

上游引物:5' CACCATGTCTACTTTTTAGATTC 3' ;

下游引物:5' TTACAGATTTTGAGTTAGA 3' 。

2. 根据权利要求1所述的胶体金试纸条,其特征在于,步骤(1)中,新型鹅细小病毒的单克隆抗体在胶体金溶液中的终浓度为9 μ g/ml。

3. 根据权利要求1所述的胶体金试纸条,其特征在于,步骤(1)中,所述封闭液中含有5%

BSA和0.2% Tween-20。

4.根据权利要求1所述的胶体金试纸条,其特征在于,步骤(1)中,所述碳酸钠溶液中含有1%BSA和0.2%叠氮化钠;所述碳酸钠溶液的pH为8.5;碳酸钠溶液的浓度为0.002mol/L。

5.根据权利要求1所述的胶体金试纸条,其特征在于,步骤(2)中,胶体金颗粒标记的新型鹅细小病毒的单克隆抗体在玻璃纤维膜上的涂覆量为 $1\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 。

6.根据权利要求1所述的胶体金试纸条,其特征在于,步骤(3)中,兔抗新型鹅细小病毒VP1蛋白的多克隆抗体稀释至1.6mg/ml,将羊抗鼠IgG抗体稀释至1mg/ml,用量均为 $1\mu\text{l}/\text{cm}$;然后点射于硝酸纤维素膜上,形成检测线和质控线。

一种检测新型鹅细小病毒的胶体金试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及预防兽医学检验领域,具体涉及一种检测新型鹅细小病毒的胶体金试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 2010年春天以来,在我国华北地区发生了一种传染性疾病,该病主要引起雏鸭发育迟缓,上下喙萎缩,舌头外伸、肿胀,感染后期胫骨和翅骨易发生骨折。该病主要导致肉鸭出栏合格率下降,造成较大的经济损失。根据临床症状,将该病命名为短喙长舌综合征。山东农业大学禽病研究所确定了该病的病原为新型鹅细小病毒。

[0003] 新型鹅细小病毒属细小病毒科细小病毒属无囊膜单股DNA病毒。新型鹅细小病毒仅有一个血清型,与本属其它病毒不发生交叉血清学反应。与传统的新型鹅细小病毒进行氨基酸序列比对,结果显示其变异主要发生在位于VP1蛋白上的受体结合位点序列,而受体结合位点被认为与病毒的毒力和宿主特异性密切相关。

[0004] 目前,新型鹅细小病毒的检测方法主要有血清学检测方法、分子生物学检测方法以及病毒培养和电镜观察方法等。虽然以上方法的建立在新型鹅细小病毒的预防、诊断和监测中发挥了重要作用,但由于其操作复杂、耗时并且需要特殊的一些设备而使其在基层养殖场检验检疫中受到限制,因此,亟需建立快速、敏感、特异并能用于新型鹅细小病毒基层养殖场直接检验的方法。

发明内容

[0005] 针对上述现有技术,本发明的目的是提供一种检测新型鹅细小病毒的胶体金试纸条及其制备方法。采用该胶体金试纸条检测新型鹅细小病毒,检测时间短、成本低、结果易判断,适用性强,非常适合于基层养殖场中新型鹅细小病毒的检测。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] 本发明的第一方面,提供一种检测新型鹅细小病毒的胶体金试纸条,所述胶体金试纸条包括PVC板,依次搭接固定于PVC板上的样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸;

[0008] 所述结合垫是结合有胶体金颗粒标记新型鹅细小病毒单克隆抗体的玻璃纤维膜;

[0009] 所述硝酸纤维素膜上沿样品流动方向依次设有检测线和质控线,所述检测线包被兔抗新型鹅细小病毒VP1蛋白的多克隆抗体,所述质控线包被羊抗鼠IgG抗体。

[0010] 优选的,所述硝酸纤维素膜为whatman硝酸纤维素膜IMMUNOPORE®诊断膜。

[0011] 优选的,所述玻璃纤维膜为Ahlstrom8964。

[0012] 本发明的第二方面,提供上述胶体金试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0013] (1) 调节胶体金溶液的pH为9.0,向胶体金溶液中加入新型鹅细小病毒的单克隆抗体,使单克隆抗体的终浓度为8-10 μ g/ml;震荡反应25-35min,加入封闭液,再震荡反应15-25min,离心,弃去上清,将沉淀用含有BSA和叠氮化钠的碳酸钠溶液溶解,制备得到胶体金颗粒标记的新型鹅细小病毒的单克隆抗体;

[0014] (2) 将步骤(1)制备的胶体金颗粒标记的新型鹅细小病毒的单克隆抗体涂在玻璃纤维膜上,得到结合垫;

[0015] (3) 将兔抗新型鹅细小病毒VP1蛋白的多克隆抗体和羊抗鼠IgG抗体分别点射于硝酸纤维素膜上,形成含有检测线和质控线的硝酸纤维素膜;

[0016] (4) 在PVC板上依次搭接固定样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,即制备得到胶体金试纸条。

[0017] 优选的,步骤(1)中,所述胶体金溶液按照如下方法制备:

[0018] 在去离子水中加入1%氯金酸溶液,加热至沸腾,再加入6ml 1%柠檬酸三钠溶液,至不变色;再加热反应10min,停止加热,搅拌15min,即制备得到胶体金溶液;所述去离子水、1%氯金酸溶液和1%柠檬酸三钠溶液加入的体积比为200:2:6。

[0019] 优选的,步骤(1)中,所述胶体金溶液中的胶体金的粒径为25-30nm。

[0020] 优选的,步骤(1)中,新型鹅细小病毒的单克隆抗体在胶体金溶液中的终浓度为9 μ g/ml。

[0021] 优选的,步骤(1)中,所述封闭液中含有5%BSA和0.2%Tween-20。

[0022] 优选的,步骤(1)中,所述碳酸钠溶液中含有1%BSA和0.2%叠氮化钠;所述碳酸钠溶液的pH为8.5;碳酸铵溶液的浓度为0.002mol/L。

[0023] 优选的,步骤(2)中,胶体金颗粒标记的新型鹅细小病毒的单克隆抗体在玻璃纤维膜上的涂覆量为1 μ l/cm²。

[0024] 优选的,步骤(3)中,兔抗新型鹅细小病毒VP1蛋白的多克隆抗体稀释至1.6mg/ml,将羊抗鼠IgG抗体稀释至1mg/ml,用量均为1 μ l/cm;然后点射于硝酸纤维素膜上,形成检测线和质控线。

[0025] 本发明的有益效果:

[0026] 本发明的胶体金试纸条操作简单,特异性好,敏感性高,诊断结果可靠;适用于新型鹅细小病毒的现场检测,尤其适用于基层单位或个人的现场快速检测。

附图说明

[0027] 图1:本发明的检测新型鹅细小病毒的胶体金试纸条的结构示意图;其中,A-样品垫,B-结合垫,C-硝酸纤维素膜,D-吸水纸,E-检测线,F-质控线,G-PVC板。

[0028] 图2:本发明的胶体金试纸条的结果判定图;图中,T-检测线,C-质控线。

具体实施方式

[0029] 应该指出,以下详细说明都是例示性的,旨在对本申请提供进一步的说明。除非另有指明,本文使用的所有技术和科学术语具有与本申请所属技术领域的普通技术人员通常理解的相同含义。

[0030] 正如背景技术部分所介绍的,对于新型鹅细小病毒的检测方法而言,分子生物学检测具有检测特异性好、检测灵敏度高等优点,但是耗时长,需要特殊的仪器设备,不适合基层检测;血清学检测方法较分子生物学检测耗时较短,操作较为简便,但存在较大的非特异性而容易存在假阳性问题;所以亟需建立快速、敏感、特异并能用于新型鹅细小病毒基层养殖场直接检验的方法。基于此,本发明的目的是提供一种检测新型鹅细小病毒的胶体金

试纸条。

[0031] 在本发明的一种实施方案中,给出的检测新型鹅细小病毒的胶体金试纸条,其结构包括:

[0032] PVC板,依次搭接固定于PVC板上的样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸;

[0033] 所述结合垫是结合有胶体金颗粒标记新型鹅细小病毒单克隆抗体的玻璃纤维膜;

[0034] 所述硝酸纤维素膜上沿样品流动方向依次设有检测线和质控线,所述检测线包被兔抗新型鹅细小病毒VP1蛋白的多克隆抗体,所述质控线包被羊抗鼠IgG抗体。

[0035] 上述胶体金试纸条中,硝酸纤维素膜又称为NC膜,在胶体金试纸条中用作检测线和质控线的载体,同时也是免疫反应的发生处,所以硝酸纤维素膜的种类对于检测结果的特异性、灵敏度、显色及背景颜色等方面均有显著的影响,为提升检测的特异性、灵敏度并便于观察,本发明对多种不同种类的硝酸纤维素膜进行了优化考察,结果发现,whatman硝酸纤维素膜 IMMUNOPORE®诊断膜与其他种类的硝酸纤维素膜相比,具有层析速度快、无背景显色、检测线显色深、无非特异性显色等优势,所以本发明选择whatman硝酸纤维素膜 IMMUNOPORE®诊断膜作为硝酸纤维素膜。

[0036] 结合垫是用于结合金标抗体的,对于结合垫所用材料的选择,一方面要考虑材料对金标抗体的结合量,另一方面还要考虑对金标蛋白活性的影响。经优选,本发明以玻璃纤维膜为Ahlstrom8964来结合金标抗体,其性能最优。

[0037] 在本发明的另一种实施方案中,给出了上述胶体金试纸条的制备方法,具体如下:

[0038] (1) 制备新型鹅细小病毒单克隆抗体;

[0039] (2) 制备兔抗新型鹅细小病毒VP1蛋白的多克隆抗体;

[0040] (3) 制备胶体金以及胶体金颗粒标记的新型鹅细小病毒的单克隆抗体;

[0041] (4) 胶体金试纸条的组装:将胶体金颗粒标记的新型鹅细小病毒的单克隆抗体涂在玻璃纤维膜上,室温下自然干燥,密封。用兔抗新型鹅细小病毒的多毒VP1蛋白的多克隆抗体用于检测线显示,羊抗鼠IgG抗体用于质控线显示。将硝酸纤维素膜放在喷点仪平台上。将两抗体分别放于样品池中,开启机器,让兔抗新型鹅细小病毒的多毒VP1蛋白的多克隆抗体及羊抗鼠IgG抗体分别点射于膜上形成两条线。置于室温下干燥1h。将硝酸纤维素膜贴于PVC底板中间,然后将吸水纸及金标垫分别以稍稍重叠的方式贴于硝酸纤维素膜两侧。再将样品垫稍稍压住金标垫并贴于底板上,用切条机切成4mm的试纸条。并将试纸条装在胶体金塑料卡板上,4℃冰箱保存。

[0042] 对于新型鹅细小病毒单克隆抗体和兔抗新型鹅细小病毒VP1蛋白的多克隆抗体,可以采用市售的产品,也可以采用如下方法进行制备,其中,单克隆抗体的制备方法如下:

[0043] 将新型鹅细小病毒病毒液通过接种11日龄鸭胚进行大量括毒,取尿囊液并通过超高速离心法对病毒进行浓缩,将浓缩的病毒液再通过蔗糖密度梯度离心法进行纯化。将纯化好的病毒液作为免疫原免疫6-8周龄Balb/c小鼠,初次接种剂量为60ug/只,之后每隔两周加强免疫,共加强免疫3次,每次接种剂量为30ug/只。融合前,再次用纯化病毒冲击免疫小鼠。通过ELISA实验检测其效价。收集小鼠脾细胞,与事先准备好的骨髓瘤细胞进行融合,用1% HAT培养液培养。融合2周左右,采用间接ELISA方法筛选出阳性杂交瘤细胞株,并对筛选后的阳性杂交瘤细胞进行克隆,得到1株杂交瘤细胞株D3B2。选取10周龄经产Balb/c小鼠,腹腔注射石蜡油0.5ml,7天后分别注射两株新型鹅细小病毒杂交瘤细胞株,接种量均为

1×10^6 个/0.5ml。待小鼠腹部膨大后分别抽取腹水,5000rpm离心10min,取上清,通过正辛酸硫酸铵法纯化,得到纯化后的新型新型鹅细小病毒单克隆抗体D3B2。

[0044] 新型鹅细小病毒VP1蛋白的多克隆抗体的制备方法如下:

[0045] 针对新型鹅细小病毒VP1全基因序列设计了一对特异性引物,利用PCR技术扩增,得到2199bp的VP1基因全序列。根据同源重组的原理,利用拓扑异构酶I,将此基因克隆到原核表达载体pDE1中,获得了重组质粒pDE1-VP1。将重组质粒转化至大肠杆菌E.coli BL21中,经终浓度为0.2mmol/L IPTG诱导大量表达,经过6h后,表达量达到高峰。收集菌液并用超声波裂解细胞,并分别收集上清及沉淀进行SDS-PAGE分析,结果表明目的蛋白主要以包涵体的形式存在,通过不同浓度尿素对蛋白进行变性处理,得到纯化的蛋白。将VP1重组蛋白与弗氏佐剂混和后免疫兔,通过ELISA方法检测血清抗体效价,经过4次免疫,两个月后采血并收集血清,通过正辛酸-硫酸铵法对血清进行纯化,得到纯化的兔抗新型鹅细小病毒多克隆抗体。

[0046] 所述特异性引物为:

[0047] 上游引物:5' CACCATGTCTACTTTTTTAGATTC 3' ;

[0048] 下游引物:5' TTACAGATTTTGAGTTAGA 3' 。

[0049] 上述制备方法中,所述正辛酸硫酸铵法纯化抗体的具体方法如下:将血清3000r/min,离心15min,之后对上清用滤器过滤,过滤后的溶液中边搅拌边加入4倍血清体积的60mmol/L PH=4.5的醋酸盐缓冲液,搅拌30min。边搅拌边加入正辛酸,至终浓度达到33 μ l/ml稀释血清。完成后将混合液8000r/min离心30min,上清用滤纸过滤,以弃去悬浮的物质,并将滤液的PH调到7.4。滤液边搅拌边加入配好的饱和硫酸铵溶液,待滤液出现白色浑浊时,继续搅拌30min。4℃静置5h。静置后加入到离心管中,12000r/min离心30min,弃去上清,沉淀用0.01mol/L PH=9.0的Tris-Cl重悬,在200倍体积的0.01mol/L PH=9.0的Tris-Cl中,透析5h,收集透析袋内液体,即为纯化完成的抗体。

[0050] 对于胶体金的制备,本发明采用的方法如下:

[0051] 用电热套将200ml去离子水在200rpm搅拌下100℃煮沸,加入2ml 1%氯金酸溶液至沸腾,再加入6ml 1%柠檬酸三钠溶液,至不变色,再加热10min,后停止加热,搅拌15min,恢复室温,恢复体积,胶体金制备完成,4℃保存备用。

[0052] 采用上述方法制备的胶体金颗粒的粒径为25-30nm。良好质量的胶体金颗粒是获得优良性能的胶体金试纸条的前提,胶体金颗粒大小不均一、形状不规则,不利于蛋白的标记,容易形成裸金颗粒,所制备的金标蛋白不稳定,致使非特异性反应的发生;而适度大小的胶体金颗粒的选择,也是胶体金试纸条制备的关键,胶体金颗粒过大,其层析速度慢,容易发生聚集,试纸条的灵敏度高,但特异性差,容易出现假阳性,且不宜保存;而粒径过小,其层析速度快,特异性好,但试纸条的灵敏度低,容易出现假阴性,因此,必须综合考虑检测样品,选择合适粒径的胶体金颗粒。经验证,采用本发明方法制备的胶体金颗粒粒径大小均一、分布均匀、形状规则、无聚集现象,胶体金颗粒的粒径为25-30nm时特别适合于新型鹅细小病毒单克隆抗体的标记。

[0053] 逐级稀释法确定新型鹅细小病毒单克隆抗体D3B2与胶体金的用量比例,具体过程如下:准备8个1.5ml管,加入1ml胶体金溶液,并将溶液用碳酸钾溶液调节pH为9.0,将新型鹅细小病毒单克隆抗体D3B2从5 μ g起,每级增加2.5 μ g,分别加入到8个管中,震荡10min。混

匀后,加入10%NaCl溶液,震荡10min,静置2h。确定第一个保持红色不变时加入单抗的量,即为最低稳定蛋白量,在此基础上增加20%用量,即为胶体金与单克隆抗体标记的最佳浓度。当单克隆抗体含量达到7.5 μ g时,可保持胶体金红色不变,所以最佳的单克隆抗体与胶体金用量比例为9 μ g:1ml。

[0054] 按照此比例,先将配置好的胶体金溶液用碳酸钾溶液调节pH为9.0后,加入单克隆抗体D3B2并使终浓度为9 μ g/ml,震荡30min,加入封闭液(5%BSA+0.2%Tween-20),再震荡20min。离心10min,取出上清,沉淀用复溶液溶解,免疫胶体金制备完成,4 $^{\circ}$ C保存备用。所述复溶液为含有1%BSA和0.2%叠氮化钠的0.002mol/L碳酸钠溶液(pH8.5)。

[0055] 封闭可以防止和减少样品或标记物对整个膜的非特异性吸附,封闭也可以用于控制层析速度和稳定测试、控制线蛋白。在其他条件不变的情况下,不同的封闭液封闭效果差异比较大,非特异性显色明显不同。本发明考察了不同组成的封闭液对胶体金试纸条反应速度、膜的背景颜色、金标水化均匀度、特异性和灵敏度等方面的影响,以从中选择出最佳的封闭液组成。本发明通过实验发现,在封闭液中添加一定量的Tween-20,可以提高反应的特异性,但Tween-20的浓度过高则会引起反应速度减慢、膜的背景颜色加深和反应灵敏度降低等。通过综合分析比较,本发明最终发现,采用5%BSA+0.2%Tween-20作为本发明的封闭液具有最佳的检测效果。

[0056] 本发明的胶体金试纸条的检测原理为:试纸条根据“抗体-抗原-抗体”夹心免疫层析原理设计,滴加样品后,在毛细作用下,样品溶液向上迁移,达到结合垫时,金标抗体将被溶解。当样品中为新型鹅细小病毒阳性时,新型鹅细小病毒将和金标抗体结合,并一起向上迁移,达到固定有兔抗新型鹅细小病毒VP1蛋白的多克隆抗体的检测线时,形成“多克隆抗体-病毒-金标抗体”复合物,最终形成一条红色沉淀线,而未被固定的金标抗体继续上行至羊抗鼠IgG抗体处,形成“金标抗体-IgG”复合物,形成红色沉淀线,此线为质控线。当样品为新型鹅细小病毒阴性时,金标抗体溶解在样品中,并一起向上迁移,达到固定有兔抗新型鹅细小病毒VP1蛋白的多克隆抗体的检测线时,不能被固定,检测线处不出现红色条带,未被固定的金标抗体继续上行至羊抗鼠IgG抗体处,形成“金标抗体-IgG”复合物,形成红色沉淀线,此线为质控线。

[0057] 本发明以鹅细小病毒VP1蛋白的多克隆抗体作为检测抗体,与单克隆抗体相比,多克隆抗体制备的更加简便,且具有较强反应原性,其敏感性未发现较单克隆抗体下降。

[0058] 为了使得本领域技术人员能够更加清楚地了解本申请的技术方案,以下将结合具体的实施例详细说明本申请的技术方案。

[0059] 本发明实施例和对比例中所用的试验材料均为本领域常规的试验材料,均可通过商业渠道购买得到。

[0060] 新型鹅细小病毒记载在文献:Chen H,Dou Y,Zheng X,et al.Hydropericardium hepatitis syndrome emerged in cherry valley ducks in China[J].Transboundary and emerging diseases,2017,64(4):1262-1267.公众可从山东农业大学禽病研究所获得。

[0061] 实施例1:新型鹅细小病毒单克隆抗体的制备

[0062] 将新型鹅细小病毒病毒液通过接种11日龄鸭胚进行大量括毒,取尿囊液并通过超高速离心法对病毒进行浓缩,将浓缩的病毒液再通过蔗糖密度梯度离心法进行纯化。将纯

化好的病毒液作为免疫原免疫6-8周龄Balb/c小鼠,初次接种剂量为60ug/只,之后每隔两周加强免疫,共加强免疫3次,每次接种剂量为30ug/只。融合前,再次用纯化病毒冲击免疫小鼠。通过ELISA实验检测其效价。收集小鼠脾细胞,与事先准备好的骨髓瘤细胞进行融合,用1% HAT培养液培养。融合2周左右,采用间接ELISA方法筛选出阳性杂交瘤细胞株,并对筛选后的阳性杂交瘤细胞进行克隆,得到6株杂交瘤细胞株。通过琼脂扩散试验及间接免疫荧光试验筛选出其中的1株杂交瘤细胞株D3B2。

[0063] 选取10周龄经产Balb/c小鼠,腹腔注射石蜡油0.5ml,7天后分别注射两株新型鹅细小病毒杂交瘤细胞株,接种量均为 1×10^6 个/0.5ml。待小鼠腹部膨大后分别抽取腹水,5000rpm离心10min,取上清,之后对上清用滤器过滤。

[0064] 过滤后的上清通过正辛酸硫酸铵法纯化:向上清中边搅拌边加入4倍血清体积的60mmol/L PH=4.5的醋酸盐缓冲液,搅拌30min。边搅拌边加入正辛酸,至终浓度达到33μl/ml稀释血清。完成后将混合液8000r/min离心30min,上清用滤纸过滤,以弃去悬浮的物质,并将滤液的PH调到7.4。滤液边搅拌边加入配好的饱和硫酸铵溶液,待滤液出现白色浑浊时,继续搅拌30min。4℃静置5h。静置后加入到离心管中,12000r/min离心30min,弃去上清,沉淀用0.01mol/L PH=9.0的Tris-Cl重悬,在200倍体积的0.01mol/L PH=9.0的Tris-Cl中,透析5h,收集透析袋内液体,即为纯化完成的抗体。

[0065] 实施例2:新型鹅细小病毒多克隆抗体的制备

[0066] 针对新型鹅细小病毒VP1全基因序列设计一对特异性引物,具体如下:

[0067] 上游引物:5' CACCATGTCTACTTTTTTAGATTC 3' (SEQ ID NO.1);

[0068] 下游引物:5' TTACAGATTTTGAGTTAGA 3' (SEQ ID NO.2)。

[0069] 利用PCR技术扩增,得到2199bp的VP1基因全序列(如SEQ ID NO.3所示)。根据同源重组的原理,利用拓扑异构酶I,将此基因克隆到原核表达载体pDE1中,获得了重组质粒pDE1-VP1。将重组质粒转化至大肠杆菌E.coli BL21中,经终浓度为0.2mmol/L IPTG诱导大量表达,经过6h后,表达量达到高峰。收集菌液并用超声波裂解细胞,并分别收集上清及沉淀进行SDS-PAGE分析,结果表明目的蛋白主要以包涵体的形式存在,通过不同浓度尿素对蛋白进行变性处理,得到纯化的蛋白。将VP1重组蛋白与弗氏佐剂混和后免疫兔,通过ELISA方法检测血清抗体效价,经过4次加强免疫,两个月后采血并收集血清,通过正辛酸-硫酸铵法对血清进行纯化,得到纯化的兔抗新型鹅细小病毒多克隆抗体。

[0070] 实施例3:胶体金的制备

[0071] 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金:用电热套将200ml去离子水在200rpm搅拌下100℃煮沸,加入2ml 1%氯金酸溶液至沸腾,再加入6ml 1%柠檬酸三钠溶液,至不变色,再加热10min,后停止加热,搅拌15min,恢复室温,恢复体积,胶体金制备完成,4℃保存备用。

[0072] 实施例4:免疫胶体金的制备

[0073] 采用逐级稀释法确定新型鹅细小病毒单克隆抗体D3B2与胶体金的用量比例:准备8个1.5ml管,加入1ml胶体金溶液,并将溶液用碳酸钾溶液调节pH为9.0,将新型新型鹅细小病毒单克隆抗体D3B2从5μg起,每级增加2.5μg,分别加入到8个管中,震荡10min。混匀后,加入10%NaCl溶液,震荡10min,静置2h。确定第一个保持红色不变时加入单抗的量,即为最低稳定蛋白量,在此基础上增加20%用量,即为胶体金与单克隆抗体标记的最佳浓度。当单克隆抗体含量达到7.5μg时,可保持胶体金红色不变,所以最佳的单克隆抗体与胶体金用量比

例为9 μ g:1ml。

[0074] 按照此比例,先将配置好的胶体金溶液用碳酸钾溶液调节pH为9.0后,加入单克隆抗体D3B2并使终浓度为9 μ g/ml,震荡30min,加入封闭液(5%BSA+0.2%Tween-20),再震荡20min。离心10min,取出上清,沉淀用0.002mol/L pH8.5碳酸钠溶液(含有1%B SA和0.2%叠氮化钠)溶解,免疫胶体金制备完成,4℃保存备用。

[0075] 实施例5:试纸条的组装

[0076] 将免疫胶体金(即有胶体金颗粒标记的新型鹅细小病毒单克隆抗体)涂在玻璃纤维膜(B)上,室温下自然干燥,密封。用兔抗新型鹅细小病毒的多毒VP1蛋白的多克隆抗体用于检测线(E)显示,羊抗鼠IgG抗体用于质控线(F)显示。将硝酸纤维素膜(C)放在喷点仪平台上,再将两抗体分别放于样品池中,开启机器,让兔抗新型鹅细小病毒的多毒VP1蛋白的多克隆抗体及羊抗鼠IgG抗体分别点射于膜上形成两条线,其中兔抗新型鹅细小病毒的多毒VP1蛋白的多克隆抗体的浓度为1.6mg/ml,羊抗鼠IgG抗体的浓度为1mg/ml,用量均为1 μ l/cm。置于室温下干燥1h。将硝酸纤维素膜(C)贴于PVC底板(G)中间,然后将吸水纸(D)及金标垫(B)分别以稍稍重叠的方式贴于硝酸纤维素膜(C)两侧。再将样品垫(A)稍稍压住金标垫(B)并贴于底板(G)上,用切条机切成4mm的试纸条。并将试纸条装在胶体金塑料卡板上,4℃冰箱保存。组装好的试纸条如图1所示。

[0077] 用小型巴氏吸管吸取待检测动物的组织匀浆的上清液或鸭胚尿囊液样品加入加样孔中,3-5min即可显示结果,通过观察检测线和质控线的颜色即可判断被检鸭或鸭胚中是否带有新型鹅细小病毒或被新型鹅细小病毒感染。

[0078] 结果判定如图2所示:

[0079] 阳性:在检测线(T)和质控线(C)处各出现一条红色条带,判定为阳性。检测线(T)条带色泽的深浅程度可判断新型鹅细小病毒的抗原含量的高低,抗原含量越高条带颜色越深,反之越浅。

[0080] 阴性:在质控线(C)出现一条红色条带,检测线(T)未出现条带,说明检测样品中没有新型鹅细小病毒的存在。

[0081] 无效:仅在检测线(T)有条带或者两条线均没有条带出现,可判定试纸条检测无效。

[0082] 实施例6:特异性试验

[0083] 采用本发明的试纸条分别对实验室保存的新型鹅细小病毒,禽流感病毒(H5,H7,H9),鸭肝病毒,坦布苏病毒,禽腺病毒,呼肠孤病毒及番鸭细小病毒进行检测。

[0084] 结果表明,试纸条只与新型鹅细小病毒反应,而不与其他病毒反应,说明试纸条没有交叉反应性。

[0085] 实施例7:敏感性试验

[0086] 将浓度为1.2mg/ml的新型鹅细小病毒浓缩液梯度稀释为120 μ g/ml、12 μ g/ml、1.2 μ g/ml、120ng/ml、12ng/ml、1.2ng/ml,分别用PCR,琼扩和胶体金试纸条检测。

[0087] 结果表明,本发明的胶体金试纸条可以检测出1.2ng/ml的新型鹅细小病毒,具有较高的检测灵敏度。

[0088] 实施例8:稳定性试验

[0089] 将试纸条储存于4℃冰箱4月后重新进行特异性及敏感性试验,结果显示没有出现

明显下降。

[0090] 实施例9:重复性试验

[0091] 组内重复检测:

[0092] 用一批次的本发明试纸条检测新型鹅细小病毒阴性样品、阳性样品个30份(三次重复试验)。结果显示,本发明的试纸条检测的阴性、阳性结果分别为30例,表明该试纸条具有良好的组内重复性。

[0093] 组间重复检测:

[0094] 用三个不同批次的本发明试纸条检测新型鹅细小病毒阴性样品、阳性样品个30份(三次重复试验)。结果显示,本发明的试纸条检测的阴性、阳性结果分别为30例,表明该试纸条具有良好的组间重复性。

[0095] 实施例10:临床样品检测

[0096] 对实验室保存的92份疑似感新型鹅细小病毒的临床样品分别利用本发明的胶体金试纸条,琼扩试验及PCR进行检测。

[0097] 检测结果表明:胶体金试纸条及PCR检出组织匀浆的数量分别为36、37;阳性尿囊液检出数分别为50、50;两者符合率分别为97.3%及100%,总体符合率为98.6%。而琼扩试验几乎检测不到样品。

[0098] 以上所述仅为本申请的优选实施例而已,并不用于限制本申请,对于本领域的技术人员来说,本申请可以有各种更改和变化。凡在本申请的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本申请的保护范围之内。

[0001]	SEQUENCE LISTING
[0002]	<110> 山东农业大学
[0003]	<120> 一种检测新型鹅细小病毒的胶体金试纸条及其制备方法
[0004]	<130> 2018
[0005]	<160> 3
[0006]	<170> PatentIn version 3.5
[0007]	<210> 1
[0008]	<211> 24
[0009]	<212> DNA
[0010]	<213> 人工序列
[0011]	<400> 1
[0012]	caccatgtct acttttttag attc 24
[0013]	<210> 2
[0014]	<211> 19
[0015]	<212> DNA
[0016]	<213> 人工序列
[0017]	<400> 2
[0018]	ttacagattt tgagttaga 19
[0019]	<210> 3
[0020]	<211> 2199
[0021]	<212> DNA
[0022]	<213> VP1基因
[0023]	<400> 3
[0024]	atgtctactt ttttagattc ttttgaagag tggtatgaga ctgcagccgc ctcgtggcgg 60
[0025]	aatctgaaag ctggagcccc tcagccaaaa ccaaccagc agtctcagtc tgtgtctcca 120
[0026]	gacagagaac ccgaacgaag agataataat cggggctttg tacttcctgg ctataagtat 180
[0027]	cttgggcctg gtaacggcct tgataaaggc ccacctgtca acaaggcgga cagcgctcgg 240
[0028]	cttgaacacg acaaggccta cgacctacag cttaaagcgg gagacaatcc atatataaaa 300
[0029]	ttcaatcacg ctgaccagga ctttatagat agcctccaac acgaccactc atttgagggt 360
[0030]	aatcttggaa aggctgtatt ccaggccaaa aaacgtatct tagagccatt cggcctagta 420
[0031]	gaagagccta tcaacacggc tcctgcaaaa aaaaatacag ggaagcttac tgaccattac 480
[0032]	ccagtagtta agaagcctaa actcaccgag gaagtcagtg cgggaggtgg tagcagtgtc 540
[0033]	gtacaagacg gaggagccac cgcggagggc accgaacctg tggcagcatc tgaaatggca 600
[0034]	gagggaggag gcggagctat gggcgactct tcagggggtg ccgatggagt gggtaatgcc 660
[0035]	tcgggaaatt ggcattgcga ttcccaatgg atgggaaaca cagtcatcac aaagaccacc 720
[0036]	agaacctggg tcctgccaaag ctacaacaat cacatctaca aagcaattac cagtggaacc 780
[0037]	tctcaagatg caaatgtcca gtatgctgga tacagtaccc cctgggggta ctttgatttc 840
[0038]	aatcgcttcc actgccactt ctcccctaga gactggcaga gacttatcaa caaccattgg 900

[0039]	ggaatcagac ccaagtctct taaattcaag atcttcaatg ttcaagtcaa ggaagtcaca	960
[0040]	acgcaggatc agacaaagac cattgcaaac aatctcacct caacaatcca agttttttacg	1020
[0041]	gatgatgagc accaactccc gtatgtcctg ggctcggcta cggaaggac catgccgccg	1080
[0042]	ttcccgtcgg atgtatatgc cctgccgcag tacgggtact gcacaatgca caccaaccag	1140
[0043]	aatggagcac ggttcaatga ccgtagcgca ttctactgct tagagtactt ccctagtcag	1200
[0044]	atgctgagaa caggtaacaa ctttgagttc acatttgact ttgaagaagt tcctttccac	1260
[0045]	agcatgttcg ctcatcaca ggacttagac aggettatga accccctagt ggatcaatac	1320
[0046]	ctctggaatt tcaatgaggt agacagcaac agaaatgctc aattttaaaaa agctgtgaaa	1380
[0047]	ggggcttatg gcaccatggg ccgcaattgg ctgccgggac ctaaatccct ggatcagaga	1440
[0048]	gttagggcct acacaggagg aacagacaat tatgcaaact ggaacatctg gaataatggg	1500
[0049]	aacaaggtga atttaaagga caggcagtat ctctacaac ccggacctgt gtcagctact	1560
[0050]	cacacagaag gggaggcttc cagcatecca gctcagaata ttttagggat agctaaagat	1620
[0051]	ccatacagat ctggcagcac tacagcagga ataagtata ttatggtcac ggacgagcag	1680
[0052]	gaagtagcac ccacgaatgg agtagggtgg aaaccatatg gtaggactgt aacgaatgaa	1740
[0053]	caaaacacta ctacagctcc tacaagttca gatctggatg ttcttgagc tttaccagga	1800
[0054]	atggtgtggc agaacagaga tatatatctg caggaccta tttgggcaaa aataccgaag	1860
[0055]	actgatggca aattccatcc ttctccaaat ctcgaggat ttggcctgca caatccacca	1920
[0056]	ccacaggtct tcatcaagaa tacaccagta cctgcagacc ctccagtaga atatgtgaac	1980
[0057]	cagaagtgga actcctacat aactcaatac tctacaggcc agtgtacagt agaaatggtg	2040
[0058]	tgggagctga gaaaagagaa ttcaaagaga tggaaccag aaatccagtt caccagcaat	2100
[0059]	ttcagtaaca gaactagtat aatgtttgca cctaataaaa ctggtggata tgtagaagat	2160
[0060]	agattgattg gaaccagata tctaactcaa aatctgtaa	2199

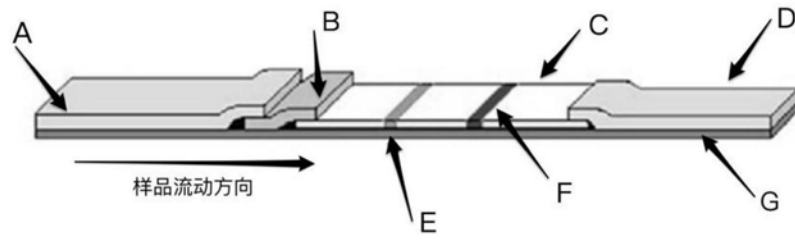


图1

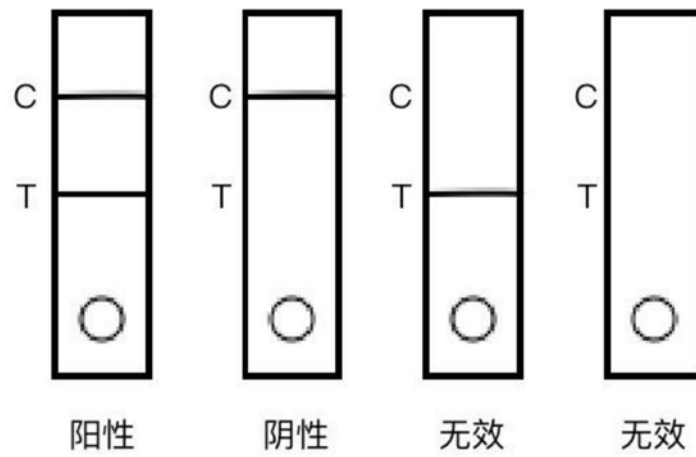


图2